



Bolsas Universidade de Lisboa / Fundação Amadeu Dias

Edição 2011/2012

Relatório de Projeto

Pesquisa de resíduos de pesticidas em saladas prontas a consumir

Bolseiro(a): Marco Cavaco

Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa
Curso: Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
Ano: 2011/2012

Tutor(a): Prof^ª. Doutora Luísa Mateus
Prof^ª. Doutora Noélia Duarte

Julho de 2012



O trabalho apresentado neste relatório foi realizado na
Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa
(Departamento de Ciências Toxicológicas e Bromatológicas)

Modo de apresentação do projeto: **Poster**

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
LISTAGEM DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	V
ENQUADRAMENTO	1
Generalidades.....	1
Pesticidas.....	1
Saladas prontas a consumir	2
OBJETIVO(S) DO PROJETO.....	3
METODOLOGIA APLICADA	4
Amostra.....	4
Pesticidas.....	4
Análise	6
Método de Extração dos Pesticidas	7
Reagentes	7
Soluções e Padrões.....	8
Condições analíticas GC/MS	8
Preparação da amostra	8
RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
EXECUÇÃO FINANCEIRA.....	12
CONCLUSÕES	12
BIBLIOGRAFIA.....	13

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Condições analíticas do cromatógrafo e do espectrómetro de massa**Erro!**
Marcador não definido.

Tabela 2 Tempo de retenção, massa molar, iões seleccionados**Erro!** **Marcador não**
definido.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estruturas dos pesticidas seleccionados para o presente estudo 5

Figura 2 Resumo da preparação da amostra 9

Figura 3 Cromatograma iónico total (TIC) com a mistura de todos os pesticidas (A) e os SIRs referentes a: pirimicarbe (B), iprovalicarbe (C), fenehexamida (D), padrão interno, TPP (E) e deltametrina (F). 11

Figura 4 Cromatogramas resultantes da análise por GC/MS de duas soluções de pesticidas a 5 e 50 ppm 11

Figura 5 Cromatograma resultante da análise de uma amostra de salada após fortificação com uma solução de 25 ppm de pesticida 12

LISTAGEM DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DGADR	Direção-Geral da Agricultura e Desenvolvimento Rural
ECD	Detetor de captura eletrónica (<u>E</u> lectronic <u>C</u> apture <u>D</u> etector)
FAO	Organização de Alimentos e Agricultura (<u>F</u> ood and <u>A</u> griculture <u>O</u> rganization)
GC	Cromatografia em fase Gasosa (<u>G</u> as <u>c</u> hromatography)
HPLC	Cromatografia em fase líquida de alta resolução (<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
LMR	Limites Máximos de Resíduos
m/z	Relação massa-carga
MS	Espetroscopia de Massa (<u>M</u> ass <u>s</u> pectroscopy)
NPD	Detetor de fósforo e azoto (<u>N</u> itrogen and <u>p</u> hosphorus <u>d</u> etector)
ppm	Partes por milhão
QuEChERS	Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro (<u>Q</u> uick, <u>E</u> asy, <u>C</u> heap, <u>E</u> ffective, <u>R</u> ugged and <u>S</u> afe)
SIR	Gravação do ião selecionado (<u>S</u> elected <u>i</u> on <u>r</u> ecording)
SPE	Extração em fase sólida (<u>S</u> olid <u>p</u> hase <u>e</u> xtraction)
TIC	Cromatograma iónico total (<u>T</u> otal <u>i</u> onic <u>c</u> hromatogram)
TPP	Trifenilfosfato
t _R	Tempo de retenção

ENQUADRAMENTO

Generalidades

A transição do período paleolítico para o período neolítico acontece devido ao início das atividades agrícolas (Mazoyer & Roudart, 2001). Tal como a história da escrita, os primórdios da agricultura são incertos, mas admite-se que tenha surgido em diferentes lugares do mundo e de forma independente, nos vales fluviais habitados pelas antigas civilizações. Com o início desta prática houve um acréscimo da oferta de alimento à população, sendo as plantas cultivadas próximas destas para o seu fácil acesso. Deste modo, as frequentes e perigosas incursões em busca de alimento eram evitadas, aumentando o sedentarismo das diversas civilizações.

A agricultura permite a existência de aglomerados humanos com maior densidade populacional, sendo esta prática o suporte da caça e da colheita. A importância da prática da agricultura na história do Homem é tanto elogiada como criticada. Por um lado, o grupo que se fixou na terra tinha mais tempo dedicado a atividades com objectivos diferentes de produzir alimentos, que resultaram em novas tecnologias e acumulação de bens capitais, culminando na melhoria do padrão de vida das diversas sociedades. Por outro lado, os grupos que continuaram a coletar alimentos nativos, mantiveram um equilíbrio ecológico com o ambiente, ao contrário da nova sociedade agrícola que se fixou, introduzindo a monocultura que resulta no desgaste do solo.

Dependendo do índice de produtividade procurado, pode diferenciar-se a agricultura em agricultura de subsistência ou comercial. Relativamente à primeira, há produção de alimento suficiente para as necessidades de uma família ou pequena comunidade – sistema extensivo – com auxílio de técnicas como a queimada, sendo a mão-de-obra a grande força operária. Por outro lado, a agricultura comercial visa a produção de plantas de acordo com a demanda do mercado – sistema intensivo. Para isso, utiliza grande quantidade e diversidade de maquinaria, fertilizantes e pesticidas o que leva a altos índices de produtividade.

Pesticidas

A necessidade de introdução de pesticidas na prática agrícola ocorreu devido à necessidade de suportar a procura de produtos agrícolas que tem vindo a aumentar ao longo das últimas décadas. A FAO¹ (*Food and Agriculture Organization*) define os pesticidas como:

¹ www.fao.org/index_en.htm (21 de Junho de 2012)

“(…) any substance or mixture of substances intended for preventing, destroying or controlling any pest, including vectors of human or animal disease, unwanted species of plants or animals causing harm during or otherwise interfering with the production, processing, storage, transport or marketing of food, agricultural commodities, wood and wood products or animal feedstuffs, or substances which may be administered to animals for the control of insects, arachnids or other pests in or on their bodies.”

Os produtos fitofarmacêuticos têm sido amplamente utilizados desde meados do séc. XX, altura em que surgiu uma sociedade mais industrializada e o ritmo de vida disparou. Baseado na compilação do *British Crop Protection Council*², em 2003, aproximadamente 860 substâncias ativas são atualmente formuladas em pesticidas. Estas substâncias pertencem a mais de 100 classes. Carbamatos, organofosforados, piretróides, sulfonilureias, ou triazinas são os grupos mais importantes atualmente.

Apesar das inúmeras vantagens que advêm da sua utilização, como o menor tempo dispendido na produção de uma grande quantidade de alimento e menores custos associados à produção agrícola, existem potenciais efeitos adversos que levam à sua utilização moderada. O alerta para os potenciais efeitos nefastos dos pesticidas foi dado pela extensa utilização do DDT na década de 60 (McCauley & all, 2006). Este pesticida, que fora descoberto em 1939 por Paul Muller, ficou associado a inúmeros problemas de saúde de diversas espécies de aves e grandes riscos para a biodiversidade. Para além de problemas ambientais, estes químicos induzem resistência dos seus alvos, problemas de saúde devido a resíduos na comida e contaminação das águas subterrâneas.

A sua extensa utilização na sociedade moderna requer uma ampla monitorização dos resíduos existentes nos diversos produtos agrícolas, uma vez que, mesmo em quantidades vestigiais, poderão ser responsáveis por problemas de saúde pública.

Saladas prontas a consumir

As *saladas prontas a consumir* que, nos últimos anos, têm vindo a ganhar cada vez maior importância no mercado nacional deverão ser submetidas a vários ensaios de controlo de qualidade, incluindo o fitoquímico, de modo a garantir a sua segurança alimentar. Este aspeto é muito importante neste tipo de amostras, uma vez que uma das mais valias para o consumidor é a seguinte informação que é realçada na embalagem *“Não precisa ser lavada”*. Deste modo, e dada a enorme divulgação e utilização dos pesticidas na produção dos produtos hortícolas, e a crescente procura destes produtos frescos prontos a consumir, é fundamental, para a segurança do

² www.bcp.org (21 de Junho de 2012)

consumidor, a existência de um rigoroso controlo de qualidade. A facilidade de preparação e de consumo de uma grande variedade de produtos hortícolas, nem sempre facilmente disponíveis, leva a que muitas vezes os consumidores optem por este tipo de produtos em detrimento dos habituais vegetais frescos comprados a granel.

O ritmo frenético em que atualmente vivemos, aliado à falta de tempo levam a que esta seja uma opção simples, prática e rápida, sendo as mulheres entre os 25 e 34 anos o grupo que mais utiliza diariamente as *saladas prontas a consumir*. No entanto, assiste-se atualmente a um aumento do grupo populacional que adquire estas saladas, estando as pessoas idosas e, inclusivamente os homens, a consumir cada vez mais estes produtos. Só assim se explica que este mercado já preconize globalmente 1.000.000.000 dólares/ano, aumentando 10% ao ano (Nielsen, 2006).

Os produtos fitofarmacêuticos (ou pesticidas) têm sido amplamente utilizados na agricultura em geral. A sua tutela e supervisão é assegurada pela **Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural – DGADR**³, que estabelece os pesticidas que podem ser utilizados bem como por quem podem ser comercializados. Para além disso, também refere os **Limites Máximos de Resíduos (LMR)** que poderão ser encontrados nos produtos agrícolas analisados pelas entidades competentes. Apesar disso, não há referência à segurança dos hortícolas utilizados nas *saladas prontas a consumir* pelo que testá-la reveste-se de grande importância.

OBJETIVO(S) DO PROJETO

Propõe-se a realização de um projeto de investigação que tem como objetivo a pesquisa de resíduos de pesticidas em *saladas prontas a consumir*, disponíveis nas grandes superfícies do mercado português. Para tal, proceder-se-á em primeiro lugar a uma prospeção de mercado de modo a obter uma amostragem significativa. Seguir-se-á o estudo e seleção do método de preparação da amostra mais adequado. O desenvolvimento do método analítico será realizado utilizando a técnica de cromatografia gasosa com detetor de espectrometria de massa (GC-MS).

O trabalho realizado foi dividido em três fases, sendo a primeira a recolha de informação atual sobre a utilização de pesticidas na agricultura portuguesa, de modo a permitir uma seleção dos produtos químicos mais utilizados. Numa segunda fase procedeu-se à análise do mercado português e seleção das *saladas prontas a consumir* para que seja possível obter uma amostragem significativa. Por último, desenvolveu-se e otimizou-se o método analítico com a aplicação da técnica de GC/MS, para que

³ www.dgadr.pt (12 de Maio de 2012)

seja possível a análise das amostras obtidas nas grandes superfícies comerciais da zona da grande Lisboa.

METODOLOGIA APLICADA

Amostra

No mercado nacional existe uma grande diversidade de *saladas prontas a consumir*, o que reflete o enorme impacto que têm na sociedade atual. Para perceber esta diversidade e averiguar qual seria o objeto de estudo neste projeto, foi feito um levantamento de todas as marcas e tipos de saladas comercializadas em Portugal, estando essa informação inserida no Anexo 1. No entanto, dadas as limitações relativas à duração do projeto, as eventuais interferências que uma matriz mais complexa comporta numa extração para análise por GC, bem como as diferentes metodologias que devem ser utilizadas para as diferentes extrações, o leque de possibilidades de análise foi reduzido.

A amostra representativa incidiu nas *saladas prontas a consumir* que só continham alface na sua constituição. A escolha da alface como elemento de análise foi efetuada por ser um hortícola presente na grande maioria das saladas comercializadas e pela facilidade de obtenção de amostras cultivadas na total ausência de pesticidas, podendo funcionar como branco na análise. Assim, após a execução da pesquisa de resíduos de pesticidas nas alfaces utilizando a metodologia que se explicita mais à frente, poder-se-á generalizar um procedimento analítico semelhante para outros hortícolas presentes nos diferentes tipos de *saladas prontas a consumir*.

A aquisição das amostras foi realizada nas respetivas áreas comerciais, tendo sido compradas todas as marcas que cumpriam os requisitos para a análise, isto é, só terem alface na sua constituição.

Pesticidas

Dada a enorme variedade de pesticidas existentes, passíveis de serem utilizados em Portugal, a escolha dos pesticidas a pesquisar revelou-se complexa e difícil. A seleção dos mais utilizados na produção dos produtos hortícolas que constituem as *saladas prontas a consumir* reveste-se da maior importância. Uma seleção errada destes pesticidas poderia pôr em causa as conclusões do trabalho.

Deste modo, esta escolha assentou em diversos critérios como sejam (1) o diálogo com produtores locais sobre os pesticidas utilizados preferencialmente nas suas culturas, (2) correspondência com fabricantes de *saladas prontas a consumir*, (3)

diálogo com representantes de diversas marcas de pesticidas e (4) pesquisa bibliográfica sobre análises similares realizadas no âmbito de outros projetos.

Com base nas informações recolhidas considerámos que os pesticidas deltametrina, fenehexamida, fosetil-alumínio, imidaclopride, iprovalicarbe, mancozebe e pirimicarbe (Anexo 2) seriam os mais utilizados na cultura de alfaces e, por conseguinte, deveriam ser os compostos a pesquisar no nosso estudo. Nesta mesma tabela encontram-se algumas informações relacionadas com a estabilidade destes compostos, bem como a sua solubilidade. Esta informação foi fundamental para escolher o solvente mais adequado à dissolução de cada pesticida, uma vez que quando se procede à mistura de todos os pesticidas para posterior fortalecimento das amostras, não devem existir problemas de solubilidade. Os padrões foram armazenados no laboratório de acordo com a instrução constante no boletim informativo de cada um.

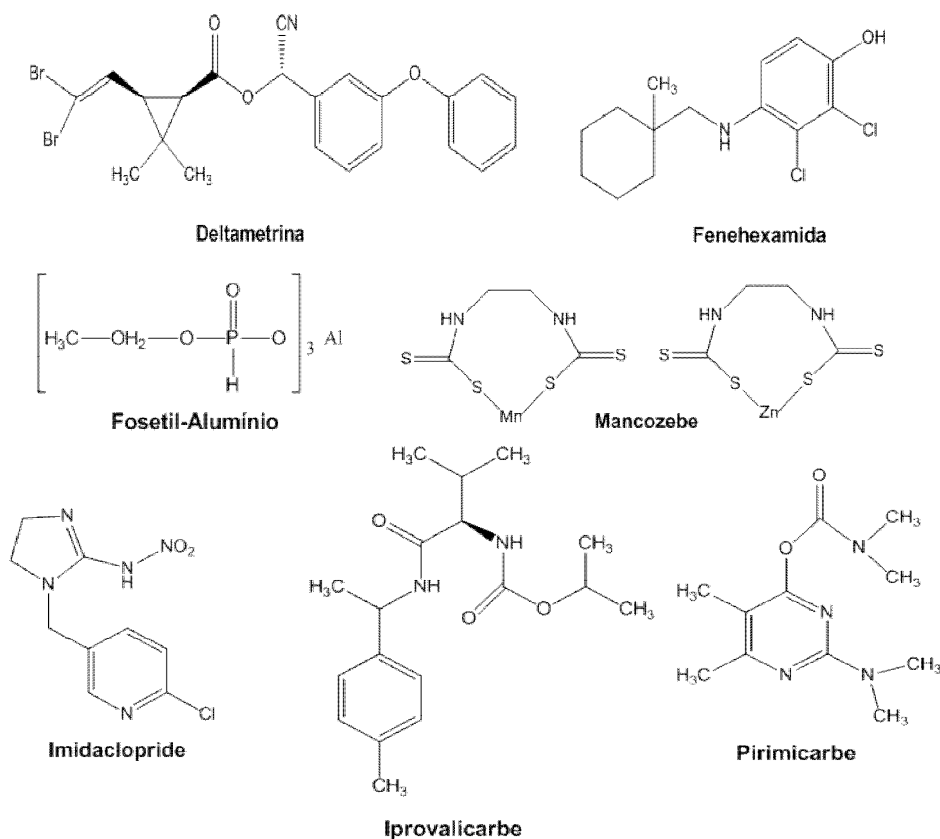


Figura 1 Estruturas dos pesticidas selecionados para o presente estudo

No entanto, apesar de toda a informação recolhida, constatámos que alguns dos pesticidas colocavam alguns problemas para uma correta análise. Estes problemas estavam relacionados com a sua solubilidade e identificação no espectro de GC-MS. Assim, o pesticida mancozebe foi excluído da análise por apresentar problemas de

solubilidade dificilmente ultrapassáveis e o fosetil-alumínio por não ser identificado pelo espectrómetro de massa, muito possivelmente devido a problemas de volatilidade.

Análise

Na literatura existem inúmeros artigos onde são referidas diferentes metodologias aplicadas no tratamento da amostra a analisar, extração e identificação dos resíduos de pesticidas. No entanto, apesar de tamanha diversidade, a totalidade dos artigos está relacionada com produtos hortícolas a granel recolhidos diretamente do produtor ou de áreas comerciais específicas, como mercados ou superfícies comerciais.

Na grande maioria dos métodos analíticos descritos na bibliografia, a amostra previamente pulverizada é extraída com uma mistura hidroalcoólica (Albero & Taldeo, 2004). Relativamente à extração há inúmeras técnicas utilizadas, sendo a partição com solventes orgânicos (Albero & Taldeo, 2004), a cromatografia de permeação em gel (Knezevic & Serdar, 2009) e a extração em fase sólida (SPE) e carvão ativado (Wang & Jiang, 2008) as mais praticadas nas diferentes análises. Para a correcta identificação dos pesticidas poderão ser utilizadas diferentes técnicas de análise (Torres & Mañes, 1996) que se deverão adequar às propriedades físico-químicas dos pesticidas. No entanto, apesar da diversidade de técnicas, aquelas que são amplamente utilizadas nos diversos laboratórios de análise são a cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia em fase gasosa (GC).

A cromatografia gasosa (GC) corresponde a uma análise química instrumental por separação de compostos químicos de uma amostra complexa (Lampman, Kritz, & Engel, 2006). O fundamento deste método instrumental de análise consiste na existência de duas fases, uma fase estacionária (coluna) que possui diferentes propriedades físicas e químicas e uma fase móvel (gás vector) na qual os diferentes constituintes da amostra se deslocam com fluxo específico. Dependendo da afinidade que os analitos tenham para com a coluna, serão detetados a diferentes tempos pelo detetor. Assim, consoante as propriedades da coluna e o tempo de retenção do composto, poderá ser realizada a sua identificação, uma vez que um composto analisado nas mesmas condições apresenta sempre o mesmo tempo de retenção. Os detetores acoplados ao GC poderão ser, entre outros, o detetor de captura eletrónica (ECD) (Albero & Taldeo, 2004), o detetor azoto e fósforo (NPD) (Wang & Jiang, 2008) e o detetor de espectrometria de massa (MS) (Vidal, Arrebola, & Mateu-Sanchez, 2002),

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) recebeu este nome por utilizar um solvente como fase móvel submetido a elevada pressão e não um gás como na cromatografia gasosa, sendo um método utilizado para separação de espécies não

voláteis, podendo ser iónicas, macromoléculas e compostos termolábeis (Ahuja & Rasmussen, 2007). Possui uma fase móvel, que deverá ser um solvente que respeite as características impostas pelo método analítico, nomeadamente, dissolver a amostra sem interferir com a mesma, e uma fase estacionária que estabelecerá interação com os analitos dissolvidos influenciando a sua eluição. Os detetores mais utilizados neste tipo de cromatografia são os fotométricos (baseados na absorvância no ultravioleta e no visível); os fluorescentes (utilizados como método de deteção específico); detetores por índice de refração e os espectrómetros de massa.

Método de Extração dos Pesticidas

Apesar da diversidade de técnicas praticadas atualmente para a análise de resíduos de pesticidas, há a necessidade de implementar métodos que apresentem baixo custo e sejam rápidos e de fácil execução, para que se consiga analisar um maior número de amostras num menor intervalo de tempo. Desta forma, e cumprindo um dos objetivos do projeto, foi utilizada uma metodologia baseada no trabalho feito pelo Centro de Pesquisa da Regional Leste do Departamento Estudanidense de Agricultura em Wyndmoor, denominado QuEChERS.

O método QuEChERS (Zhao, Wylie, & Stevens, 2012) é uma abordagem simplificada que torna mais fácil e menos dispendiosa, a análise de resíduos de pesticidas nos alimentos. O seu nome é uma palavra formada a partir da junção **Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe**, isto é, rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro, respetivamente. Algumas modificações no método QuEChERS original foram introduzidas para garantir a extração eficiente de compostos dependentes do pH, para minimizar a degradação de compostos suscetíveis e para expandir o espectro de matrizes abrangidas.

Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de qualidade p.a. ou superior. Acetonitrilo (LiChrosolv® Merck, >99,8%), ácido fórmico (p.a. Merck, 98-100%), água ultrapura (sistema de purificação Mili-Q, Milipore), SPE dispersivo tubo 1 (citrato, Supelco), SPE dispersivo tubo 2 (PSA/ENVI-Carb, Supelco). Pesticidas: fosetil de alumínio (Supelco, 99%), pirimicarbe (Fluka 98,5%), deltametrina (Fluka 99,7%), iprovalicarbe (Fluka 98,7%), fenehexamida (Fluka 99,7%) e imidaclopride (Fluka 99,9%). Padrão interno: trifenilfosfato (TPP).

Soluções e Padrões

As soluções mãe dos diversos padrões foram preparadas com a concentração de 1 mg/mL. A partir destas soluções foram preparadas diariamente soluções padrão de trabalho, com concentrações ajustadas à sensibilidade do método para cada um dos pesticidas.

Condições analíticas GC/MS

A separação cromatográfica dos pesticidas foi obtida com um equipamento Perkin-Elmer® Clarus® 500 GC/MS com um injetor split/splitless programável. O volume de injeção das soluções padrão e dos extratos das amostras foi 2 µL. As condições do cromatógrafo e do espectrómetro de massa foram otimizadas utilizando uma solução contendo todos os padrões de pesticidas selecionados, e encontram-se resumidas na Tabela 1. A separação foi obtida com uma coluna SGE PBX-5 (30 m×0,25 mm×0,25 µm). A fase móvel utilizada foi o hélio, com o fluxo de 1 mL/min (150°C 29,3 cm/seg.). O espectrómetro de massa operou em modo Scan ou SIR, dependendo do objetivo da análise. O modo de ionização foi o impacto eletrónico (70eV).

Tabela 1 Condições analíticas do cromatógrafo e do espectrómetro de massa

Parâmetros GC		Parâmetros MS	
Injetor	250°C isotérmico 2,0 µL volume de injeção Injeção em split/splitless	Temperaturas	Linha de transferência 280°C Fonte de ionização 250°C
Forno	150°C (1min) 20°C/min até 210°C 210°C (1min) 10°C/min até 310°C 310°C (1min)	Aquisição MS	Modo Scan: m/z 45 a m/z 510 Modo SIR: 3 a 4 iões

Preparação da amostra

As *saladas prontas a consumir* foram adquiridas em diferentes superfícies comerciais da zona da grande Lisboa. Aproximadamente 200g de alface foram cortadas em pequenos fragmentos com dimensão semelhante. As amostras de alface cortada foram posteriormente acondicionadas em sacos de plástico, identificadas e mantidas a -20°C até serem analisadas. Amostras de alfaces adquiridas a pequenos produtores que não utilizam pesticidas foram utilizadas como controlos. De seguida, 10g (+/- 0,1g) de amostra congelada foi homogeneizada e colocada num tubo de centrifugação de 50 mL. 100 µL de padrão interno (TPP) (10 µg/mL) foram adicionados a todas as amos-

tras, incluindo o controlo, e misturados em vortex por 1 minuto. Uma alíquota de 10 mL de acetonitrilo foi adicionada a cada tudo e estes foram agitados manualmente por 1 minuto. O conteúdo do tubo SPE dispersivo 1 foi adicionado diretamente a cada tubo de centrifugação, agitado por 1 minuto e colocado em gelo até nova manipulação. Após este processo de extração, uma alíquota de 6 mL da camada superior do acetonitrilo foi transferido para o SPE dispersivo tubo 2 e misturado em vortex por 1 minuto. O tubo foi posteriormente centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos, sendo a camada superior utilizada para análise no GC/MS.

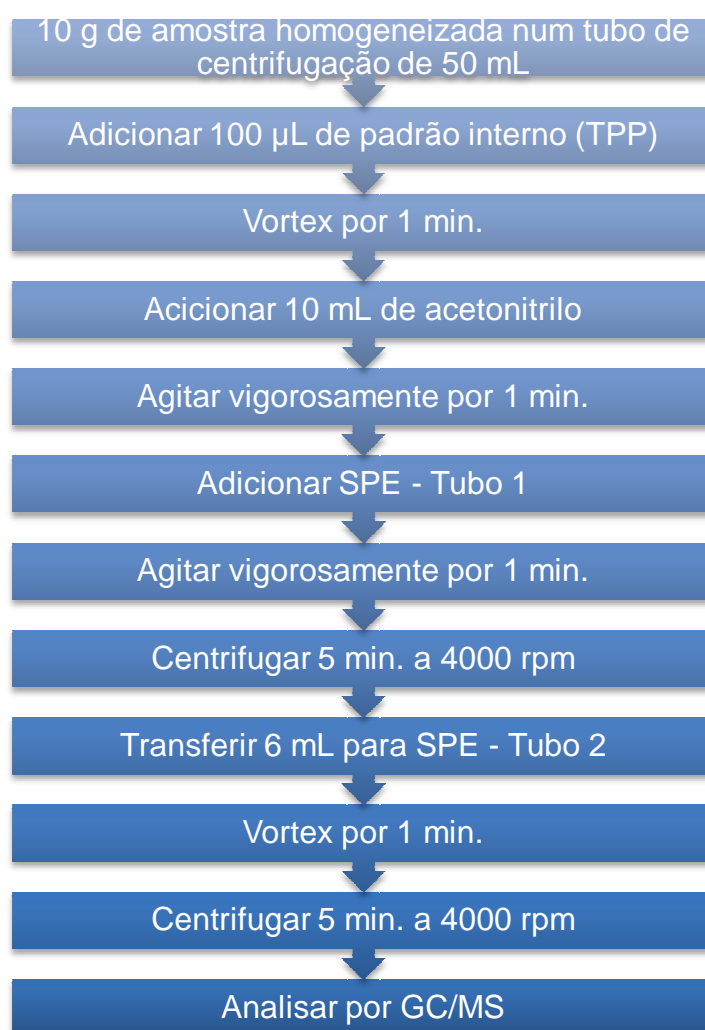


Figura 2 Resumo da preparação da amostra

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia analítica utilizada no projeto possibilitou a extração e separação de vários pesticidas, bem como a sua identificação e quantificação. Desta forma, para além de se saber qual o pesticida presente, é também possível saber a concentração deste na amostra analisada. A análise qualitativa foi conseguida por comparação dos tempos de retenção dos respetivos padrões e pela comparação das massas do ião

molecular e dos correspondentes fragmentos. Esta identificação foi ainda consolidada pela utilização de *software* de uma biblioteca de dados (NIST). Assim, com a utilização da técnica hifenada de GC/MS consegue-se uma análise qualitativa com elevado grau de certeza, uma vez que permite a junção da informação de dois métodos que só por si já são bastante robustos.

Numa análise por cromatografia, as condições cromatográficas devem ser otimizadas para que se consiga obter uma boa separação dos compostos num menor intervalo de tempo possível. De uma forma semelhante, também se deverá proceder à otimização das condições de aquisição de dados pelo espectrómetro de massa de modo a atingir uma elevada sensibilidade. Desta forma, e atendendo à elevada importância do processo de otimização destes equipamentos, esta fase requereu grande parte do tempo utilizado para a execução deste projeto. No entanto, este estudo, cujas condições se apresentam na Tabela 1, foi um passo fundamental para o sucesso do processo analítico. Após o estudo das condições cromatográficas, foram selecionados para a monitorização os iões moleculares, apresentados na Tabela 2.

A quantificação foi obtida sempre em modo SIR, empregando o método do padrão interno. Neste estudo o padrão interno utilizado foi o trifenilfosfato (TPP), que foi adicionado a todas as soluções padrão e amostras.

Tabela 2 Tempo de retenção (t_R), massa molar, iões selecionados

Pesticida	t_R (min)	M (g.mol^{-1})	SIR (m/z)
Pirimicarbe	5,9	238,29	72 (100), 166, 238
Iprovalicarbe	8,9 e 9,1	320,40	72 (100), 116, 134
Fenehexamida	10,6	302,20	97 (100), 55, 177
Padrão interno (TPP)	10,8	326,29	77 (100), 65, 170, 326
Deltametrina	15,7	505,20	181 (100), 77, 93, 253

Na Figura 3 é apresentado um cromatograma em modo Scan (m/z 45 a 530), e os SIRs de todos os compostos analisados, incluindo o padrão interno. Como se pode observar há correspondência total dos tempos de retenção e dos fragmentos escolhidos como significativos do composto. Perante estes resultados foi possível concluir que as condições analíticas foram corretamente selecionadas.

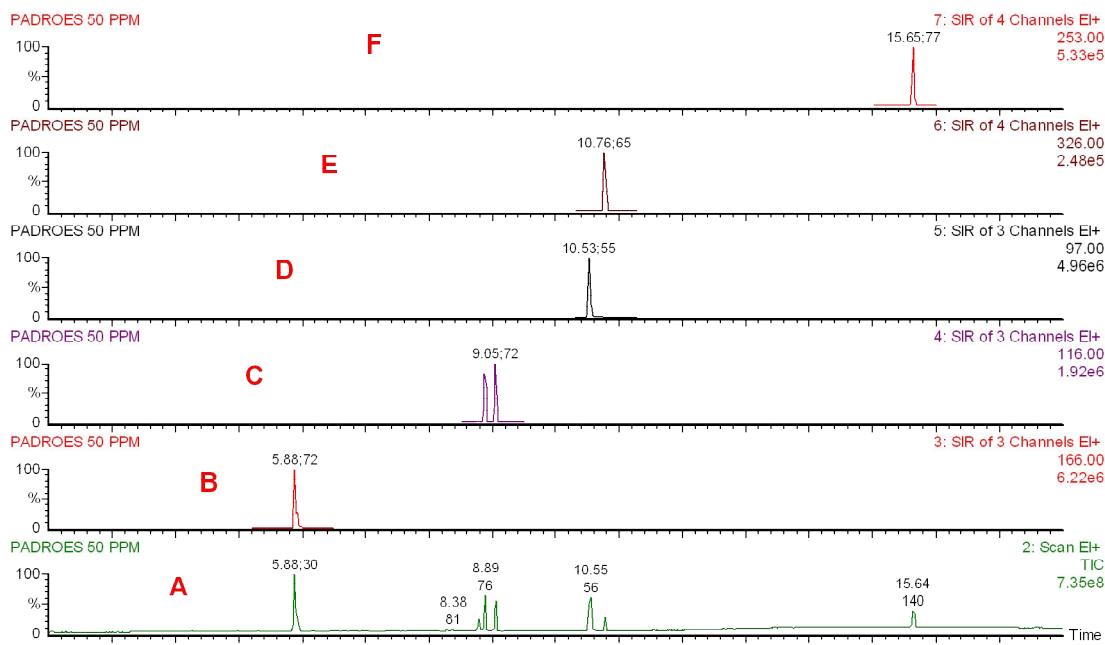


Figura 3 Cromatograma iónico total (TIC) com a mistura de todos os pesticidas (A) e os SIRs referentes a: pirimicarbe (B), iprovalicarbe (C), fenehexamida (D), padrão interno, TPP (E) e deltametrina (F).

Através da construção de curvas de calibração para os vários pesticidas, foi possível a sua quantificação, sendo a linearidade comprovada para todos os compostos entre 1 e 50 mg/L. O coeficiente de correlação teve sempre valores superiores a 0,996.

Na Figura 4 podem ser observados dois cromatogramas referentes a soluções padrão de pesticidas com diferentes concentrações (5 e 50 ppm). O iprovalicarbe encontra-se normalmente sob a forma de dois isómeros, daí a existência de dois picos com tempos de retenção próximos dos 9 minutos.

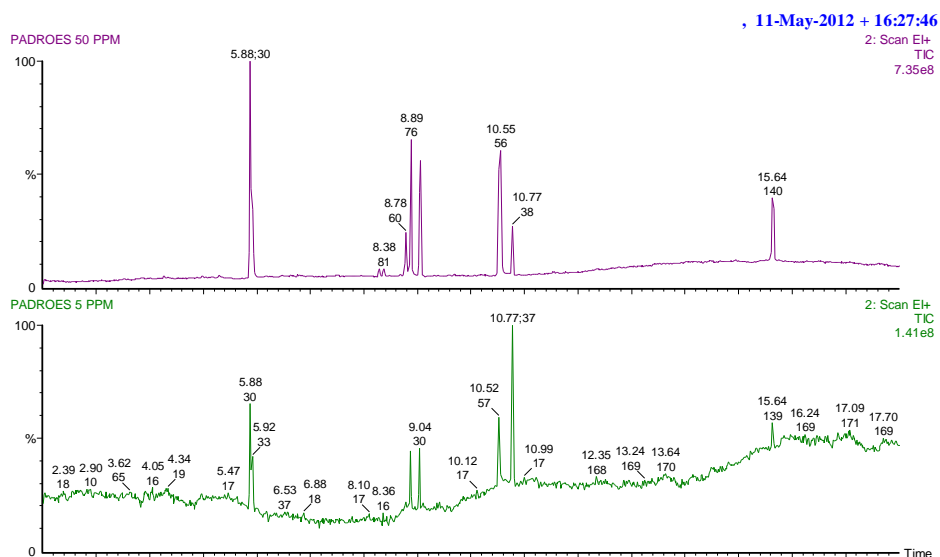


Figura 4 Cromatogramas resultantes da análise por GC/MS de duas soluções de pesticidas a 5 e 50 ppm

Durante o estudo, foram analisadas várias amostras de *saladas de alface prontas a consumir*. Como as amostras analisadas apresentaram concentrações não detetáveis dos pesticidas, optou-se por fortificar as amostras com uma solução com todos os pesticidas numa concentração conhecida. Na Figura 5 está representado um exemplo de um cromatograma obtido.

Comparando as áreas resultantes da fortificação das amostras com as áreas obtidas com a fortificação das alfaces utilizadas como controlo negativo, verificou-se que não se observaram diferenças significativas.

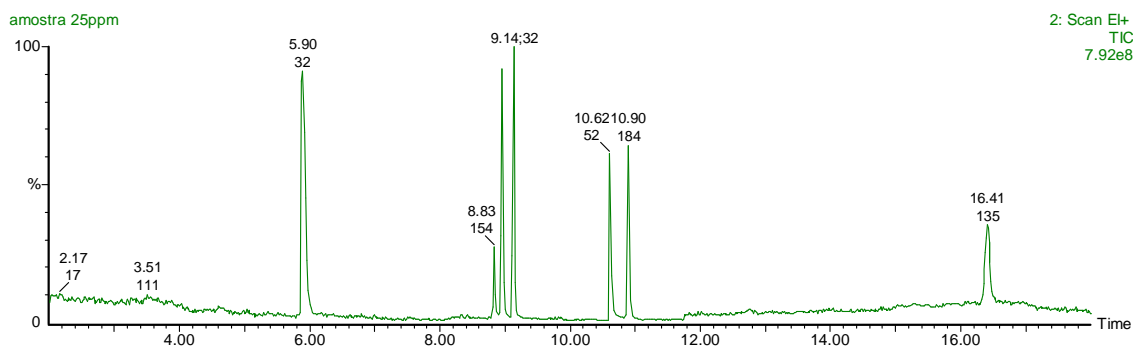


Figura 5 Cromatograma resultante da análise de uma amostra de salada após fortificação com uma solução de 25 ppm de pesticida

EXECUÇÃO FINANCEIRA

Custos inicialmente previstos para o desenvolvimento do projeto:

Aquisição das amostras, reagentes, material e padrões de pesticidas: 2100 €

Utilização do equipamento de GC/MS: 1400 €

Custos efetivos:

Padrões de pesticidas e reagentes: 578,50 €

Tubos de extração em fase sólida dispersiva: 295,70 €

Garrafa de hélio BIP (Gasin): 800 €

Assistência técnica ao GC-MS: 2000 €

CONCLUSÕES

Com o presente trabalho, e atendendo aos condicionalismos anteriormente referidos neste relatório, foi possível identificar quatro dos seis pesticidas inicialmente selecionados para o estudo: pirimicarbe, iprovalicarbe, fenehexamida e deltametrina.

A extração em fase sólida dispersiva (QuEChERS) utilizada na pesquisa de resíduos de pesticidas mostrou ser um processo muito simples, rápido e eficaz. Com a utilização da espetrometria de massa acoplada à cromatografia em fase gasosa foi possível identificar e quantificar os pesticidas selecionados. Nas condições experimentais utilizadas, as amostras de saladas selecionadas não apresentaram concentrações detetáveis dos pesticidas analisados.

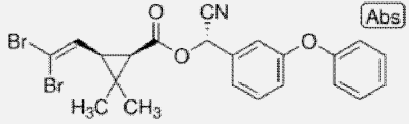
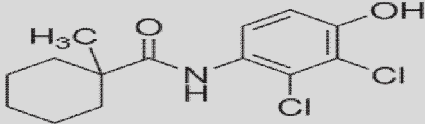
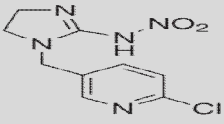
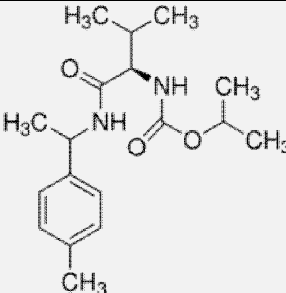
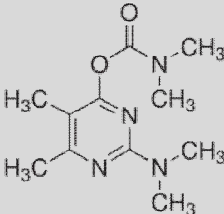
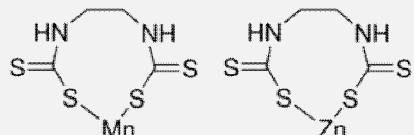
BIBLIOGRAFIA

- Ahuja, S., & Rasmussen, H. (2007). *HPLC Method Development for Pharmaceuticals*. Academic Press.
- Albero, B., & Taldeo, J. L. (2004). Analysis of Pesticides in honey by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 5828-5835.
- Alder, L., Greulich, K., Kempe, G., & Vieth, B. (2006). Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS? *Wiley InterScience* , 838-865.
- Gilbert-López, B., Garcia-Reyes, J. F., & Molina-Diaz, A. (2009). Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. *Talanta* , 109-128.
- Knezevic, Z., & Serdar, M. (2009). Screening of fresh fruit and vegetables for pesticide residues on Croatian market. *Food Control* , 419-422.
- Lampman, G. M., Kritz, G. S., & Engel, R. G. (2006). *Introduction to Organic Laboratory Techniques*. Thomson Brooks/Cole.
- Mazoyer, M., & Roudart, L. (2001). *História das agriculturas do mundo: do neolítico à crise contemporânea*. Lisboa: Instituto Piaget, D.L.
- McCauley, L. A., & all, e. (2006). Studying health outcomes in farmworker populations exposed to pesticides. *Environmental health perspectives* , 114.
- Nielsen, A. (2006). What's hot around the globe: insights on growth in food & beverages. *Executive news reports* .
- Torres, C., & Mañes, J. (1996). Determination of pesticide residues in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A* , 301-331.
- Vidal, J. M., Arrebola, F., & Mateu-Sanchez, M. (2002). Multi-residue Method for Determination of Pesticides in Vegetable Samples by GC-MS-MS. *Chromatographia* , 475-481.
- Wang, L., & Jiang, X. (2008). Analysis of Eight Organophosphorus Pesticide Residues in Fresh Vegetables Retailed in Agricultural Product Markets of Nanjing, China. *Bull Environ Contam Toxicol* , 377-382.
- Zhao, L., Wylie, P. L., & Stevens, J. (2012). Analysis of Pesticide Residues in Apple using Agilent Bond Elut QuEChERS EN Kits by GC/MS. *Agilent Technologies* .
- Zheng, S., Li, Z., & Li, J. (2009). Multi-residue determination of pesticides in vegetables by gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Bull Environ Contam Toxicol* , 111-115.

Anexo 1

Marca	Título	Constituintes	Preço
Pingo Doce	Salada Camponesa	Alface multifolhas, couve roxa, milho e cenoura	1,29
Pingo Doce	Salada Gourmet	Chicória frisada, canónigos e radichio	1,49
Pingo Doce	Salada Primum	Alface frisada e cenoura	1,49
Pingo Doce	Salada Napolitana	Escarola, rúcula e alface roxa	1,99
Pingo Doce	Alface	Alface	0,99
Pingo Doce	Salada Alentejana	Alface verde, alface roxa e coentros	1,99
Pingo Doce	Salada Ibérica	Alface frisada verde, alface frisada roxa e rúcula selvagem	1,99
Pingo Doce	Salada mista c/ nozes	Nozes, chicória e alface frisada	1,99
Pingo Doce	Salada Bonito	Escarola, chicória frisada e radichio	1,99
Pingo Doce	Salada Fresca	Alface roxa, agrião e rúcula	1,99
Pingo Doce	Salada Iceberg	Alface Iceberg	1,99
Vitacress	Salada Grega	Agrião grego, agrião água, folha de ervilha e alface roxa	3,79
Vitacress	Salada Riva	Alface frisada roxa e alface frisada verde	1,79
Vitacress	Salada Ibérica	Rúcula selvagem, alface frisada roxa e alface frisada verde	1,89
Vitacress	Salada Provençal	Escarola, alface vermelha, canónigos e cebolinho	1,89
Vitacress	Salada Mesclum	Rúcula selvagem, alface frisada roxa, acelga vermelha e mizuna	1,89
Vitacress	Salada Aromática	Alface frisada verde, alface cos vermelha e coentros	1,79
Florette	DUO	Canónigos e rúcula	1,89
Florette	Salada Gourmet	Escarola Frisada, radiccio e canónigos	2,29
Florette	Salada Vega	Escarola frisada, escarola lisa e radiccio	1,88
Florette	Alface Iceberg	Alface Iceberg	1,59
Florette	Salada Toscana	Escarola frisada, couve roxa, beterraba e cenoura	1,79
Florette	Salada Quatro Estaç.	Alface Iceberg, couve roxa e cenoura	1,69
DIA	Salada Gourmet	Chicória, radiccio e canónigos	1,48
DIA	Alface frisada	Alface frisada	1,55
DIA	Duo	Alface roxa e alface verde	1,29
DIA	Tricolor	Alface Iceberg, cenoura e radiccio	0,98
DIA	Aromática	Alface verde, alface roxa e coentros	1,79
Continente	Salada Gourmet	Alface escarola, radiccio e canónigos	1,49
Continente	Salada Mista	Radiccio, alface frisada e chicória	1,99
Continente	Salada Aromática	Alface verde, alface roxa e coentros	1,79
Continente	Salada lollo e tango	Alface Lollo e tango	1,49
Continente	Salada simples	Alface e cenoura	1,39
Continente	Salada Camponesa	Alface, cenoura, milho e couve roxa	1,99
Continente	Alface	Alface	0,99
Continente	Salada Iceberg	Alface Iceberg	0,88
Continente	Salada mista c/ nozes	Nozes, alface frisada, chicória e radiccio	1,99
Continente	Salada Ibéria	Alface frisada, alface roxa e rúcula	1,99
Lidl	Salada Gourmet	Chicória, radiccio e canónigo	1,39
Lidl	Salada Ibéria	Alface verde, alface roxa e rúcula	1,75
Lidl	Salada c/ coentros	Alface verde, alface roxa e coentros	1,99
Lidl	Salada alface e cenoura	Alface frisada e cenoura	1,29
AUCHAN	Alface trocadero	Alface trocadero	2,69
AUCHAN	Alface Iceberg	Alface iceberg	1,00
Polegar	Alface Frisada	Alface frisada	1,39
Polegar	Alface c/ cenoura	Alface e cenoura	1,30

Anexo 2

Nome	Estrutura química	Estabilidade	Solubilidade
Deltametrina		- 20 pH 4,5 – 7,5 Estável ao ar e à exposição à luz	Água: 2yg/l Isopropanol: 6 g/l Etanol: 15 g/l Xileno: 250 g/l Acetona: 500 g/l Ciclohexano: 750 g/l Tolueno: 250 g/l
Fenehexamida		pH 5,9 a 20 g/l a 20 ° Estável por 30 dias a pH 5 - 7 a 25°C	Água: 0,02 g/l Diclorometano: 31 g/l Isopropanol: 91 g/l Acetonitrilo: 15 g/l Acetona: 16 g/l Tolueno: 5,7 g/l Hexano: 0,1 g/l
Fosetil- aluminio	$[H_3C-H_2O-O-P(=O)(OH)_2]_3AL$	Estável a pH 5 – 9 a 20°C	Água: 110 g/l Heptano: 1 mg/l Acetona: 6 mg/l Xileno: 1 mg/l Metanol: 805 mg/l
Imidacloprida		Instável em pH elevado	Água: 0,51 g/l Diclorometano: 60 g/l Isopropanol: 1,6 g/l Tolueno: 0,6 g/l Hexano: 0,1 g/l
Iprovalicarbe		Estável a pH 5 – 9 a 25°C	Água: 17,8 mg/l Tolueno: 5,3 g/l Acetona: 41 g/l Acetato de etilo: 20 g/l Diclorometano: 132 g/l
Pirimicarbe		Estável durante 32 dias a pH 4 – 9 a 25°C	Água: 2,7 g/l Metanol: 230 g/l Etanol: 250 g/l Acetona: 400 g/l Xileno: 290 g/l Clorofórmio: 320 g/l
Mancozebe		2 – 8 Degrada-se em água dentro de 1 – 2 dias a pH 5, 7 e 9	Água: 6,2 mg/l